

PCT/EP200 4 / 0 5 1 6 2 6



REC'D 01 OCT 2004

WIPO

PCT

EPO - DG 1

07. 09. 2004

(79)

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. TR 2003 A 000002 del 31.07.2003**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Inoltre istanza di rettifica (pag.1) depositata alla CCIA di Terni

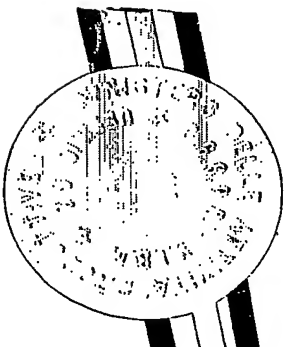
Il 22/06/2004 prot. VTR 2004-002 con allegate pagine
rettificate pag.6

Roma, li..... **23 AGO. 2004**

IL FUNZIONARIO

Massimo Piergallini
■ Dr. Massimo Piergallini

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)



MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° TR 2003 A 2



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ISRIM SOCIETA' CONSORTILE A RESPONSABILITA' LIMITATA		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 00567640552
INDIRIZZO COMPLETO	A4	LOCALITA' PENTIMA BASSA 21, 05100 TERNI (TR)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			

B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO

B0	D (D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)
B1	ISRIM - SOCIETA' CONSORTILE A RESPONSABILITA' LIMITATA
B2	LOCALITA' PENTIMA BASSA, 21
B3	05100 - TERNI - TR

C. TITOLO

C1	METODO PER LA RILEVAZIONE DI COLIFORMI ED IN PARTICOLARE ESCHERICHIA COLI
----	---

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	BODINI SERGIO
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	SANTORI FRANCESCA
NAZIONALITA'	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	



SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

E. CLASSE PROPOSTA

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI

G1	
----	--

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I

[Signature]

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME:	COGNOME	I1
DENOMINAZIONE STUDIO		I2
INDIRIZZO		I3
CAP/ LOCALITÀ/PROVINCIA		I4
L. ANNOTAZIONI SPECIALI		L1

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

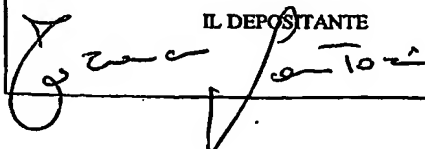


TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RES.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	2		27
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)			
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	NO
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

ATTESTATI DI VERSAMENTO	(LIRE/EURO)	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COME AUTENTICA? (SI/NO)	29180	DUECENTONOVANTUNO EURO E OTTANTA CENTESIMI
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	A	D F
	SI	
	NO	
DATA DI COMPILAZIONE	29/07/2003	

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	TR 2003 A2	
C.C.I.A.A. DI	TERNI	COD. 55
IN DATA	31/7/2003	IL/ I RICHIEDENTE/ I SOPRAINDICATO/ I HA/ HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.		FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>IL DEPOSITANTE</p>  </div> <div>  </div> <div> <p>IL FUNZIONARIO DELEGATO</p> <p>Dr. Massimo Levagna</p>  </div> </div>		

NOMINATIVO COMPLETO DEL RICHIEDENTE:

ISIRIM – Istituto Superiore di Ricerca e Formazione sui Materiali Speciali per Tecnologie Avanzate

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Gianfranco' followed by a stylized flourish.

PROSPETTO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA:

TR 2003 A 2

DATA DI DEPOSITO:

31/7/2003

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

ISRIM - Istituto Superiore di Ricerca e Formazione sui Materiali Speciali per le
Tecnologie Avanzate - Scarl

C. TITOLO Metodo per la rilevazione di Coliformi ed in particolare *Escherichia coli*

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

L'invenzione è relativa ad un metodo per rilevare Coliformi e si basa sull'utilizzo di una miscela d'aminoacidi per promuovere l'espressione d'enzimi inducibili in assenza di crescita cellulare. La soluzione d'induzione può essere utilizzata per la rapida rilevazione degli enzimi beta-glucuronidasi e/o beta-galattosidasi in un numero limitatissimo di cellule di E.coli e/o di Coliformi Totali.

P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

[Handwritten signature]

Titolo: Metodo per la rilevazione di Coliformi ed in particolare *Escherichia coli*

Sergio Bodini & Francesca Santori - ISRIM Scrl

Riassunto

L'invenzione è relativa ad un metodo per rilevare Coliformi e si basa sull'utilizzo di una miscela d'aminoacidi per promuovere l'espressione d'enzimi inducibili in assenza di crescita cellulare. La soluzione d'induzione può essere utilizzata per la rapida rilevazione degli enzimi β -glucuronidasi e/o β -galattosidasi in un numero limitatissimo di cellule di *E.coli* e/o di Coliformi Totali.

Descrizione

Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa ad un metodo per rilevare Coliformi basato sull'utilizzo di una soluzione d'induzione comprendente uno o più aminoacidi in grado di promuovere l'espressione d'enzimi inducibili in assenza di crescita cellulare. La soluzione d'induzione può essere utilizzata per l'analisi rapida di campioni contenenti un numero limitatissimo di cellule di *E.coli* e di Coliformi Totali, mediante la rilevazione degli enzimi β -glucuronidasi e β -galattosidasi.

Arte nota

Molti metodi rapidi per la rilevazione/identificazione di microrganismi sfruttano la presenza d'enzimi coinvolti in specifiche attività metaboliche. Gli enzimi possono



essere costitutivi, ossia sempre espressi, o inducibili, ovvero presenti solo in determinate condizioni metaboliche. Questo è il caso, per esempio, degli enzimi β -glucuronidasi e β -galattosidasi espressi nei batteri Coliformi in presenza di uno specifico induttore.

I batteri Coliformi rappresentano "microrganismi indicatori" d'inquinamento antropico. Essi sono distinti in Coliformi Totali e Coliformi Fecali, riconoscendo nei Totali i Coliformi diffusi sugli strati superficiali del suolo e delle acque e nei Fecali la specie *E.coli*, batteri gram-negativi termoresistenti, il cui habitat naturale è l'intestino umano o animale, causa frequente d'infezione del tratto urogenitale e di diarrea.

I Coliformi Totali sono caratterizzati dal possedere il gene che codifica per l'enzima β -galattosidasi, responsabile dell'idrolisi del lattosio in galattosio e glucosio. La determinazione della β -galattosidasi può essere eseguita con l'utilizzo di substrati cromogenici e/o fluorogenici.

β -glucuronidasi, invece, è un enzima che catalizza l'idrolisi d'acidi β -D-glucopiranosiduronici nei corrispondenti agliconi e in acido D-glucuronico e, come per β -galattosidasi, l'attività è misurata per mezzo di diversi substrati cromogenici e fluorogenici. Esso è presente nel 94-96% [Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 84:245(1976)] di ceppi di *E.coli*. Viene quindi specificatamente utilizzato per la rivelazione di *E.coli*.

L'induzione degli enzimi β -glucuronidasi e β -galattosidasi può avvenire sia utilizzando l'induttore "naturale" sia un analogo sintetico. Per stimolare la produzione cellulare di β -galattosidasi si utilizzano lattosio o composti strutturalmente simili quali metil- β -D-tiogalattopiranoside (MTG) o isopropil- β -D-



tiogalattopiranoside (IPTG) che, al contrario del lattosio, non rilasciano la parte glucosidica e non causano l'interruzione della sintesi enzimatica; nel caso invece di β -glucuronidasi si usano composti contenenti una funzionalità glucuronidica quali metil o isopropil- β -D-glucuronide. I dati in letteratura dimostrano che, ad oggi, i metodi di rivelazione dell'espressione di tali enzimi si basano sull'induzione enzimatica mediante l'uso di specifici terreni di coltura, dove la sintesi di β -galattosidasi/ β -glucuronidasi è promossa nell'ambito del processo di duplicazione cellulare.

Terreni usati per ottenere la moltiplicazione cellulare contengono fonti di carbonio (tra cui lattosio), fonti di azoto, vitamine e sali minerali.

Nel 1988 Berg e Fiksdal brevettano un metodo basato sull'uso di un terreno nutritivo di crescita, selettivo per i Coliformi, contenente lattosio, induttore della β -galattosidasi, ma arricchito con metilumbelliferil- β -D-galattoside (MUGal), substrato fluorogenico per la β -galattosidasi, utilizzato per la lettura dei risultati dopo al massimo 8 ore di incubazione. L'evoluzione di questo processo porta allo sviluppo del kit per la rivelazione rapida di Coliformi noto sotto il marchio Colifast™ (brevetti US55188894, US5292644, EP0574977, WO8904372). Utilizzando questo sistema, Tryland et al. [Wat. Sci. Tech., Vol.43 N°12 217-220 (2001)] e Farnleitner et al. [Lett. Appl. Microbiol. Vol.33 Iss.3 246-250 (2001)] evidenziano una correlazione lineare tra l'attività di β -galattosidasi e la concentrazione di Coliformi Totali, e l'attività di β -glucuronidasi e la concentrazione di *E.coli*.

Questo metodo, rispetto al metodo dell'invenzione, presenta i seguenti limiti:

1. La duplicazione cellulare introduce un'ulteriore variabile nella lettura del risultato; oltre infatti al livello di enzima prodotto da ogni singola cellula, si aggiunge la variabile del numero di cellule presente al termine del test



2. La durata del test, specie se nel campione sono presenti un numero di cellule <1000, risulta maggiore di quella prevista nel metodo oggetto dell'invenzione, a causa della necessità di attendere la fase esponenziale di crescita cellulare.

Edberg (US 4925789, 1990) introduce il concetto di "nutrient-indicator". Il terreno di coltura contiene come fonte di carbonio primaria una sostanza che viene metabolizzata ad un unico derivato rilevabile; tale composto è metabolizzabile solo dalla specie batterica in questione, definendone la presenza/assenza. Edberg specificatamente rileva *E.coli*, usando un substrato cromogenico o fluorogenico, scelto tra o-nitrofenil- β -D-glucuronide (ONPG, giallo), β -naftalamide- β -D-glucuronide (viola), α -naftol- β -D-glucuronide (rosso), metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUGlu, fluorescente). Egli inoltre propone che il terreno possa essere utilizzato per ricercare contemporaneamente *E. coli* e Coliformi Totali, scegliendo nutrienti di diverso colore come substrati per β -glucuronidasi (*E.coli*) e per β -galattosidasi (Coliformi). Essendo tali substrati chimicamente affini al lattosio essi fungono automaticamente anche da induttori enzimatici. I tempi di incubazione variano tra le 18 e le 22 ore. Il prodotto Colilert™ si basa sui principi generali rivelati da Edberg, come pure il test MMO/MUG, approvato da U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), dove ONPG viene utilizzato per i Coliformi e MUGlu per *E.coli*. Tale metodo, quindi, necessita di almeno 18 ore per la lettura dei risultati, tempo di analisi nettamente superiore a quello proposto dalla richiedente. Roth et al. (US5210022, 1993) mettono a punto un terreno di coltura per quantificare la presenza di *E.coli* e di Coliformi Totali in un campione. Il terreno limita la fonte primaria di carbonio a un substrato cromogenico per β -galattosidasi, con la formazione di un precipitato insolubile di un determinato colore a fronte della reazione enzimatica, e ad un substrato cromogenico per β -glucuronidasi, con la



formazione di un precipitato insolubile di colore diverso dal primo, dopo la reazione enzimatica. La lettura dei risultati richiede comunque un'incubazione di 24-48 ore. Da quest'idea nasce il prodotto commerciale Colichrome 2™.

Anche questo metodo, come il precedente, necessita di almeno 24 ore per la lettura dei risultati, tempo di analisi nettamente superiore a quello proposto dalla richiedente.

Simile al terreno descritto precedentemente è Mlagar, mezzo ideato da Brenner et al. [Appl. Environ. Microbiol. 1993 Nov; 59(11):3534-44] dove si utilizza MUGal per la rilevazione dell'attività di β -galattosidasi e quindi dei Coliformi Totali e indoxil- β -D-glucuronide (lbdg) per quella di β -glucuronidasi, specificatamente per *E.coli* (US6063590, 2000). Questo metodo, anch'esso basato sulla crescita cellulare, necessita di almeno 20 ore per la lettura dei risultati, tempo di analisi nettamente superiore a quello proposto dalla richiedente.

In una pubblicazione Van Poucke e Nelis [Appl. Environ. Microbiol. Vol.63 N°2 771-774 (1997)] descrivono un test chemiluminometrico per la rivelazione di Coliformi Totali e *E.coli* su terreno liquido. I tempi sono ridotti a 6 ore per i Coliformi Totali utilizzando il nuovo terreno Colicult™ con substrato e induttore Galacton-Plus e 9 ore per *E.coli* utilizzando sempre Colicult ma con Glucuron come substrato ed induttore.

Come per Berg et al. questo metodo, rispetto a quello proposto dalla richiedente, presenta limitazioni dovute alla duplicazione cellulare e tempi di analisi di durata maggiore (6-9 ore) a quelli del metodo oggetto dell'invenzione a causa della necessità di giungere alla fase esponenziale di crescita cellulare.

Grant (US5849515, 1998) propone un terreno di crescita contemporaneamente selettivo per *E.coli* e Coliformi Totali, tramite l'uso di un substrato per β -



glucuronidasi, quale il sale 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronato di cicloesilammonio (X-Gluc) e di un colorante come il cloruro di trifeniltetrazolio per la rivelazione di β -galattosidasi. Nella composizione del terreno di crescita si ritrova il lattosio come fonte di carbonio e come induttore enzimatico. Inoltre vengono introdotti gli aminoacidi, sottolineando la loro funzione di promotori di contrasto per colonie evidenzianti attività di β -glucuronidasi. L'utilizzo di questo terreno permette la lettura dopo 36-48 h. Originato dal sopradescritto lavoro è il kit per analisi di Coliformi m-Colibblue24.

Pur evidenziando l'importanza degli aminoacidi, lo spirito del brevetto è in ogni caso legato imprescindibilmente alla crescita cellulare e ad una successiva conta, dilatando i tempi di analisi.

La richiedente è comunque in grado di innalzare la sintesi enzimatica a livello cellulare indipendentemente dalle condizioni ambientali da cui sono prelevati i batteri stessi; infatti è impossibile la definizione a priori di "induzione ottimale", essendo essa fortemente dipendente dall'ambiente in cui essi si vengono a trovare.

In conclusione:

1. Metodi basati sulla conta su piastra implicano tempi d'attesa superiori alle 12 ore;
2. Metodi basati sull'analisi diretta in ambiente liquido necessitano di crescita cellulare ricadendo nel problema precedente ed inoltre creando una ulteriore variabile nella definizione di linearità tra l'attività enzimatica e numero iniziale di cellule;
3. Metodi basati sul presupposto che in determinate situazioni ambientali le attività enzimatiche delle cellule Coliformi sono naturalmente indotte, limitano



l'applicabilità universale del metodo, rendono il risultato dell'analisi soggetto a falsi negativi e risultano strettamente dipendenti dal livello di induzione enzimatica presente al momento del prelievo.

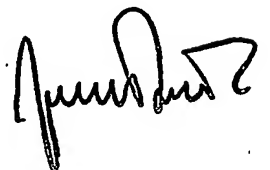
La presente invenzione si propone dunque lo scopo di mettere a punto un metodo per la rilevazione di Coliformi sensibile e veloce, condotto in assenza di crescita cellulare che superi gli inconvenienti sopra evidenziati.

Nei laboratori della richiedente è stato infatti trovato che gli aminoacidi singolarmente o in miscela, sono in grado di incrementare sensibilmente l'attività β -galattosidica e β -glucuronidica, espressa dalla singola cellula coliforme, in un processo che non implica la duplicazione cellulare; questo fenomeno permette di ottenere una quantità minima d'enzima, rilevabile in presenza di un numero di cellule estremamente basso.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione ha per oggetto una soluzione d'induzione che, in assenza di crescita cellulare, è in grado di indurre l'espressione d'enzimi inducibili; essa può essere utilizzata per la rapida rilevazione di cellule di *E.coli* e di Coliformi Totali mediante induzione degli enzimi β -glucuronidasi e β -galattosidasi. Tale soluzione comprende:

1. Almeno un aminoacido, preferibilmente una miscela d'aminoacidi, in quantità tale da non permettere una crescita cellulare rilevabile delle cellule coliformi a contatto con esso entro un intervallo di tempo fra 0 e 120 min;
2. Un sistema tampone, come ad esempio Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , preferibilmente, ma non necessariamente, a pH compreso tra 7,0 e 7,5, contenente NaCl,



preferibilmente, ma non necessariamente allo 0,00012% (p/v);

3. Ioni bivalenti e più particolarmente il magnesio Mg^{++} in concentrazione preferibilmente 0,5 mM;
4. Un induttore enzimatico (i.e. isopropil- β -D-tiogalattopiranoside per la β -galattosidasi in concentrazione preferibilmente 0,2mM e metil- β -D-glucuronide per la β -glucuronidasi in concentrazione preferibilmente 2mM, e relative miscele);

Secondo l'invenzione, gli aminoacidi sono *essenziali* per ottenere l'induzione enzimatica; la miscela d'aminoacidi può includere preferibilmente tutti i 20 aminoacidi o solo alcuni di essi in quantità preferibilmente compresa nell'intervallo tra 0,01 mM e 0,05 mM ciascuno.

In particolare essa può contenere almeno uno dei seguenti aminoacidi:

- Triptofano W.
- Almeno uno tra Metionina M e Treonina T.
- Isoleucina I e Leucina L.

In generale la miscela sopra citata d'aminoacidi naturali è preferibilmente composta da una soluzione contenente i 20 aminoacidi naturali in forma levogira (Alanina A, Cisteina C, Acido Aspartico D, Acido Glutammico E, Fenilalanina F, Glicina G, Istidina H, Isoleucina I, Lisina K, Leucina L, Metionina M, Asparagina N, Prolina P, Glutamina Q, Arginina R, Serina S, Treonina T, Valina V, Triptofano W, Tirosina Y).

Il campione da analizzare è preferibilmente un campione acquoso o qualsiasi campione in cui i microrganismi possano essere estratti al fine analitico in matrice liquida. In particolare la metodica si riferisce alla determinazione della concentrazione di Coliformi Totali o *E.coli* in acque reflue, acque superficiali, acque

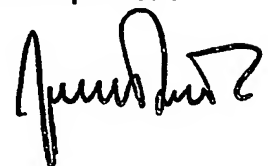


di balneazione, acque dolci, acque marine, falde acquifere. Campioni solidi come alimenti, suoli, etc., in cui sia necessaria la ricerca di Coliformi, potranno essere analizzati con questo metodo dopo opportuna estrazione in fase liquida.

Secondo come si presenta, il campione da analizzare può essere:

- Aggiunto direttamente alla soluzione d'induzione.
- Filtrato con filtro avente cut off non superiore a 0,45 micron e il filtro immerso nel minimo volume di soluzione d'induzione sufficiente per ricoprire il materiale trattenuto.
- Estratto con opportuno mezzo liquido e filtrato e la superficie del filtro messa a contatto con un volume di soluzione d'induzione.

La fase d'induzione viene eseguita ad una temperatura compresa tra 30 e 40°C per la determinazione dei Coliformi Totali e tra 30 e 50°C per la determinazione dei Coliformi Fecali o per *E.coli*, per un tempo non superiore a 120 minuti (dopo 2 ore d'incubazione si registra duplicazione cellulare). La rilevazione può essere effettuata utilizzando il saggio fluorimetrico, in sé noto, consistente nella rispettiva reazione extracellulare degli enzimi da rilevare β -galattosidasi e β -glucuronidasi con i substrati fluorescenti metilumbelliferil- β -D-galattoside (MUGal) e metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUGlu). L'inizio della reazione enzimatica è contemporaneo all'aggiunta del substrato ed al solvente di lisi cellulare ed il suo termine è in corrispondenza con l'aggiunta di soda o di potassa, che, alzando il pH, permettono un incremento del segnale di fluorescenza e contemporaneamente bloccano il continuo della reazione stessa. Non vi sono limiti di tempo per l'idrolisi, ma normalmente la sua durata di tempo è compresa tra 5 e 120 minuti e preferibilmente, ma non necessariamente, si protrae per 15 minuti. Il numero minimo di cellule rilevabili con il presente metodo è di circa 10 cellule/campione. I



tempi dell'intera reazione sono preferibilmente inferiori a 120 minuti, più preferibilmente inferiori a 60 minuti, ancor più preferibilmente inferiori a 30 minuti, ancor più preferibilmente inferiori a 15 minuti e comunque variano a seconda del numero di cellule e il metodo è così sensibile che si riescono a rilevare fino a 10 cellule per campione, benchè con tempo di analisi superiore a 20 minuti, ma pur sempre contenuti (tipicamente inferiori a 3 ore) rispetto ai metodi delle tecniche note.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione, la metodologia di rilevamento dei Coliformi si basa sull'utilizzo dei reagenti seguenti, che possono essere realizzati in forma di kit di analisi, unitamente alle metodologie appresso descritte:

- **Soluzione di Induzione Enzimatica (Reagente A):** il reagente comprende una soluzione acquosa a pH compreso tra 2 e 10 comprendente: un sistema tampone, come ad esempio Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , preferibilmente ma non necessariamente a pH 7,2; ioni bivalenti e più particolarmente il magnesio Mg^{++} , i quali ioni sono essenziali ad una concentrazione preferibilmente ma non necessariamente 0,5mM; almeno un aminoacido, preferibilmente ma non necessariamente Triptofano W, in concentrazione fino a 80mM; preferibilmente ma non necessariamente un altro aminoacido a scelta tra Metionina M e Treonina T, in concentrazione fino a 80mM e preferibilmente ma non necessariamente anche Isoleucina I e Leucina L in concentrazione fino a 80mM; in generale è preferibile ma non necessario utilizzare tutti i 20 aminoacidi naturali, promotori dell'induzione, ad una concentrazione preferibilmente ma non necessariamente 0,02mM ciascuno; un induttore della sintesi della β -galattosidasi o della β -glucuronidasi, come ad esempio isopropil- β -D-tiogalattopiranoside o metil- β -D-glucuronide e



relative miscele; un agente selettivo, con funzione permeabilizzante della membrana, come ad esempio sodiododecilsolfato; NaCl, preferibilmente ma non necessariamente allo 0,00012% (p/v); la soluzione è sterilizzata ad esempio per filtrazione su filtro avente porosità non superiore a 0,45 micron e può essere in forma liofilizzata.

- **Soluzione del Substrato Enzimatico (Reagente B):** il reagente comprende una soluzione di metilumbelliferil- β -D-galattoside (MUGal) sciolto in dimetilsolfossido e tampone fosfato, o una soluzione di metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUGlu) disciolto in una soluzione di tampone fosfato/triton-x 99/1, o una miscela delle due, preferibilmente ma non necessariamente caratterizzate dall'assenza di 4-metilumbelliferone (MU), opportunamente separato ad esempio tramite passaggio su colonna anionica (resina Amberlite IRA-410, Sigma per esempio) per ridurre la naturale presenza di 4-metilumbelliferone. Il reagente può essere in forma liofilizzata.
- **Soluzione di Amplificazione di Fluorescenza (Reagente C):** il reagente comprende una soluzione acquosa di NaOH o altra base che permette di amplificare fino a 4 volte tanto la naturale fluorescenza di 4-metilumbelliferone, effetto ottenibile a pH 11-12.
- **Solvente:** è un adatto solvente organico di lisi che provoca la rottura della membrana cellulare batterica (ad esempio cloroformio od altro adatto solvente organico di lisi).

Reagente A e Reagente B possono essere in forma liofilizzata e aggiunti al campione tal quale da esaminare ripristinando le condizioni ideali di induzione enzimatica e/o di idrolisi enzimatica, come appresso descritto.



Preferibilmente il procedimento secondo l'invenzione comprende i seguenti stadi:

1. Preparazione del campione:

Il campione può essere analizzato tal quale prelevandone una determinata quantità ed aggiungendola direttamente al Reagente A.

Campioni solidi o semisolidi possono essere estratti con la necessaria quantità di opportuno mezzo liquido (preferibilmente ma non necessariamente una soluzione fisiologica o una soluzione di tampone fosfato come quella utilizzata per l'analisi) e trattati in seguito come campioni in originale matrice acquosa.

In alternativa si può effettuare una separazione delle cellule batteriche dal campione mediante trattamento fisico, come, ad esempio, la filtrazione; pertanto un volume variabile di campione viene fatto passare attraverso un filtro avente cut-off non superiore a 0,45 micron.

2. Induzione dell'enzima:

Come già descritto il campione può essere :

- aggiunto direttamente al Reagente A.
- integrato con il materiale liofilizzato del Reagente A o di Reagente A + Reagente B e messo quindi in condizioni di induzione enzimatica.
- filtrato e il filtro immerso nel minimo volume di Reagente A sufficiente per ricoprirne il materiale trattenuto.

In tutte le varianti il sistema "campione- Reagente A" viene trattato ad una temperatura compresa tra 30 e 40 °C per i Coliformi Totali e tra 30 e 50°C per i Coliformi Fecali o per E.coli, per un tempo non superiore a 120 min, ad esempio di almeno 5 minuti, come già accennato.

3. Espressione dell'attività dell'enzima indotto tramite lisi della membrana



[Handwritten signature]

cellulare:

Prima o durante il periodo di induzione, oppure allo scadere di esso, viene aggiunta al sistema "campione-Reagente A" un'aliquota di Reagente B (preferibilmente ma non necessariamente si aggiungono allo scadere del tempo di induzione ca. 50 μ l per ogni ml di Reagente A utilizzato). Essa contiene il substrato fluorogenico. Allo scadere del tempo di induzione si procede alla rottura della membrana cellulare batterica con solvente organico (ad esempio cloroformio od altro adatto solvente organico di lisi). Questo permette la fuoriuscita dell'enzima indotto; inizia l'idrolisi del substrato fluorogenico con rilascio del fluoroforo; dopo breve agitazione, il campione viene trattato ad una temperatura non superiore a 50°C per un tempo che tipicamente può variare fra 5 e 15 min, ad esempio di 10 minuti. Allo scadere del tempo s'interrompe la reazione aggiungendo la soluzione C per portare il pH finale a oltre 11.

4. Misura:

La soluzione derivante dall'ultimo trattamento viene versata in cuvetta al quarzo e posta nel fluorimetro; la misura si esegue con lunghezze d'onda di eccitazione comprese tra 330 e 390 nm, lunghezze d'onda di emissione comprese tra 410 e 470 nm e rispettive slit comprese tra 2,5 e 20 nm. Il valore va sottratto dal bianco realizzato con le medesime condizioni del campione, esclusa la miscela inducente. In caso di assenza di interferenti si può utilizzare come bianco la soluzione finale di lettura ottenuta nelle medesime condizioni del campione eccetto l'aggiunta di cellule. Operando sul campo, al fine di considerare eventuali interferenti non filtrabili si può optare per un bianco dove viene omessa la fase di lisi cellulare.

5. Valutazione del risultato:

La risposta al test analitico viene considerata positiva quando la misura in



fluorescenza, espressa in unità arbitrarie proprie dello strumento, risulta in un incremento statisticamente significativo rispetto al valore del bianco. La positività al test può essere valutata sia qualitativamente sia quantitativamente; per qualitativamente si intende la possibilità di discriminare i Coliformi Totali dai Coliformi Fecali a seconda di quale delle due temperature di incubazione è stata utilizzata nella fase di induzione dell'enzima o Coliformi Fecali da *E.coli* a seconda di quale dei due enzimi sia stato rilevato; la valutazione quantitativa necessita di una prima curva di calibrazione dello strumento eseguita utilizzando concentrazioni note di Coliformi Totali o Fecali o di *E.coli*. Attraverso questa è possibile definire il numero di cellule di batteri Coliformi presenti nel campione originario.

Vi è dunque la necessità di costruire una retta di taratura per mettere in correlazione Unità di Fluorescenza arbitrarie dello strumento e Numero di Cellule presenti nel campione. Questo permette una correlazione indiretta tra β -galattosidasi (o β -glucuronidasi) e Numero di Cellule. La suddetta retta di taratura è peraltro inconfutabilmente ed unicamente legata alle specifiche condizioni operative. Di conseguenza ogni minima variazione dei parametri dovrà essere supportata dalla costruzione di una nuova retta di taratura che permetterà la validazione del risultato.

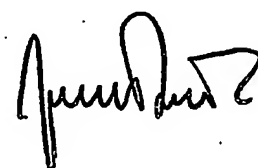
Rientra nell'ambito della seguente invenzione un kit di analisi comprendente:

- Reagenti A, B, C.
- Istruzioni per l'uso.
- Strumentazione e solventi adeguati alla conduzione del metodo.

Il sistema secondo l'invenzione, presenta i seguenti vantaggi:



1. La drastica riduzione dei tempi di analisi: i tempi dell'intera reazione sono preferibilmente inferiori a 120 minuti, più preferibilmente inferiori a 60 minuti, ancor più preferibilmente inferiori a 30 minuti, ancor più preferibilmente inferiori a 15 minuti e comunque variano a seconda del numero di cellule e il metodo è così sensibile che si riescono a rilevare fino a 10 cellule per campione, benché con tempo di analisi superiore a 20 minuti, ma pur sempre contenuti (tipicamente inferiori a 3 ore) rispetto ai metodi delle tecniche note, grazie all'uso di un nuovo mezzo di induzione capace di stimolare, in assenza di crescita numerica delle cellule, la sintesi di quantità rilevabili di β -galattosidasi e β -glucuronidasi, anche in campioni contenenti una bassa concentrazione di cellule.
2. L'uso originale di una miscela di aminoacidi (promotore di induzione) come principale generatore delle suddette proprietà del mezzo di induzione.
3. L'assenza di sostanze nutritive, e quindi nessun indebito incremento di segnale all'esame fluorimetrico dovuto alla duplicazione cellulare; l'attività enzimatica misurata è direttamente connessa ai microrganismi contenuti nel campione di partenza. Si evita così una sovrastima del risultato o perlomeno l'inserimento della variabile crescita cellulare nella correlazione tra enzima rilevato e conta cellulare.
4. La presenza dello ione magnesio Mg^{++} , quale elemento assolutamente indispensabile all'induzione delle cellule in tale sistema; gli ioni magnesio agiscono come cofattori per gli enzimi in esame.
5. L'ulteriore aumento dell'attività β -galattosidica come conseguenza dell'uso di una concentrazione più elevata di substrato raggiunta grazie alla solubilizzazione in dimetilsolfossido (DMSO) e a eventuale purificazione su



colonna anionica. La solubilizzazione in DMSO aumenta di 100 volte la solubilità di MUGal in acqua ed il passaggio su resina anionica permette un'evidente diminuzione del segnale del bianco, trattenendo la resina la percentuale di metilumbelliferone libero presente come contaminante in MUGal commerciale.

6. Aumento di rilevabilità del fluoroforo dovuto all'idrolisi enzimatica extracellulare. La presenza degli enzimi indotti è essenzialmente intracellulare. La lisi cellulare provocata dal cloroformio permette la fuoriuscita degli enzimi e la reazione con i relativi substrati avviene in soluzione all'esterno della cellula. Perciò la reazione viene accelerata e la fluorescenza del fluoroforo già libero in soluzione viene istantaneamente rilevata.

Per la rilevazione di *E. coli* e dei Coliformi Totali l'uso della soluzione di induzione, oggetto della presente invenzione, presenta i seguenti vantaggi:

1. La *riduzione dei tempi di analisi* (da 10 a 120 minuti), dovuta al processo di induzione diretta, non correlata alla crescita cellulare accoppiata all'*elevata sensibilità dell'analisi* dovuta all'azione di promozione dell'induzione degli aminoacidi che permettono di ottenere una quantità di enzima rilevabile anche in un numero limitatissimo di cellule.
2. La *precisione del risultato* e la *correlazione lineare* tra l'attività enzimatica prodotta e il numero di cellule indotte per l'*assenza di duplicazione cellulare*. La duplicazione cellulare comporta ovviamente un'ulteriore incognita nella correlazione lineare tra attività enzimatica e numero di cellule presenti.

Con la soluzione di induzione, oggetto della presente invenzione, sono state



effettuate le analisi descritte negli esempi; per la rilevazione degli enzimi β -galattosidasi e β -glucuronidasi è stato utilizzato un saggio fluorimetrico costituito dalla reazione extracellulare dell'enzima con il substrato fluorescente MUGal e MUGlu e dalla lettura fluorimetrica.

Gli esempi seguenti sono da considerare illustrativi dell'invenzione e non sono da intendere come limitativi della portata della medesima.

Esempio 1 - Induzione di attività β -galattosidica su *E.coli* e *Enterococcus faecalis* e conta cellulare in caso di positività.

1. Preparazione del campione

Vari campioni in soluzione fisiologica (NaCl 0,85% in acqua) contenenti cellule di *E.coli* (ATCC 25922) e di *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) vengono variamente diluiti. Per ogni prova viene verificato il numero di cellule tramite conta microbiologica su piastra.

2. Induzione dell'enzima

Un volume di 33 μ l per ogni campione viene singolarmente aggiunto a 2315 μ l di soluzione di induzione, a pH 7,2, presterilizzata per filtrazione su filtro idrofilo avente porosità di 0,45 micron. Essa contiene: Na_2HPO_4 47,7 mM, KH_2PO_4 22 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, 80 μ g di aminoacidi naturali (Alanina A, Cisteina C, Acido Aspartico D, Acido Glutammico E, Fenilalanina F, Glicina G, Istidina H, Isoleucina I, Lisina K, Leucina L, Metionina M, Asparagina N, Prolina P, Glutamina Q, Arginina R, Serina S, Treonina T, Valina V, Triptofano W, Tirosina Y, 4 μ g cadauno), 250 μ g di sodiododecilsolfato e 125 μ g di isopropil- β -D-tiogalattopiranoside; il campione viene poi incubato a 37°C per 75 minuti.

3. Reazione enzima – substrato dopo lisi cellulare



Allo scadere del tempo d'induzione vengono aggiunti 132 μ l di una soluzione contenente MUGal (1,5 mg/ml in dimetilsolfossido) e poi 20 μ l di cloroformio; dopo breve agitazione la soluzione di idrolisi viene incubata 45 minuti a 37°C. Allo scadere del tempo, l'idrolisi viene interrotta aggiungendo 100 μ l di soluzione contenente NaOH 2 N in acqua.

4. Misura

La soluzione viene immediatamente versata in cuvetta al quarzo e posta al fluorimetro (Perkin-Elmer LS50B); la misura viene eseguita con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 362 nm e 445 nm, e slit di eccitazione e di emissione con apertura di 2,5 nm. Non essendo presenti possibili interferenti nel campione si sceglie di utilizzare un bianco ad esso identico ma realizzato senza cellule. Si utilizza per la conta di *E.coli* una retta di taratura precedentemente messa a punto $y=30,529x$.

y = numero di cellule x = unità di fluorescenza

Slit 2,5;2,5	u.f.	u.f - B	Cellule/2ml
Bianco B	47	0	0
Campione 1	84	37	1,130
Campione 2	116	69	2,107
Campione 3	145	98	2,992
Campione 4	179	132	4,030
Campione 5	211	164	5,007
Campione 6	246	199	6,075
Campione 7	274	227	6,930
Campione 8	308	261	7,968

Campione 9	325	278	8,487
Campione 10	357	310	9,464
Enterococcus 1,2,3	47	0	Non det.

Campioni 1-10 relativi ad *E.coli*.

u.f = Unità relative di fluorescenza

B = Bianco

Esempio 2- Induzione di attività β -glucuronidica su *E.coli* e *Klebsiella Pneumoniae* e conta cellulare in caso di positività.

1. Preparazione del campione

Vari campioni in soluzione fisiologica (NaCl 0,85% in acqua) contenenti cellule di *E.coli* (ATCC 25922) e di *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) vengono variamente diluiti. Per ogni prova viene verificato il numero di cellule tramite conta microbiologica su piastra.

2. Induzione dell'enzima

Un volume di 33 μ l per ogni campione viene singolarmente aggiunto a 2315 μ l di soluzione di induzione, la cui composizione è stata riportata nell'Esempio 1, contenente come induttore 1,25 mg di metil- β -D-glucuronide; il campione viene poi incubato a 44°C per 75 minuti.

3. Reazione enzima – substrato dopo lisi cellulare

Allo scadere del tempo d'induzione vengono aggiunti 132 μ l di una soluzione contenente MUGlu [1 mg/ml in soluzione tampone fosfato (Na_2HPO_4 47,7 mM, KH_2PO_4 22 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5mM)/Triton-X 99/1] e poi 20 μ l di cloroformio;

dopo breve agitazione la soluzione di idrolisi viene incubata per altri 45 minuti a 37°C. Allo scadere del tempo, l'idrolisi viene interrotta aggiungendo 100 µl di una soluzione contenente NaOH 2 N in acqua.

4. Misura

La soluzione viene immediatamente versata in cuvetta al quarzo e posta al fluorimetro (Perkin-Elmer LS50B); la misura viene eseguita con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 362 nm e 445 nm, e slit di eccitazione e di emissione con apertura di 5 nm. Non essendo presenti possibili interferenti nel campione si sceglie di utilizzare un bianco ad esso identico ma realizzato senza cellule. Si utilizza per la conta di *E.coli* una retta di taratura precedentemente messa a punto $y=30,993x$.

y = numero di cellule

x = unità di fluorescenza

Slit 5;5	u.f.	u.f - B	Cellule/2ml
Bianco	27	0	0
Campione 1	84	14	434
Campione 2	116	31	961
Campione 3	145	48	1488
Campione 4	179	61	1891
Campione 5	211	77	2386
Campione 6	246	89	2758
Campione 7	274	115	3564
Campione 8	308	127	3936
Campione 9	325	149	4618



Handwritten signature

Campione 10	357	147	4556
Klebsiella 1,2,3	27	0	Non det.

Campioni 1-10 relativi ad *E.coli*.

u.f = Unità relative di fluorescenza

B = Bianco

Esempio 3- Induzione di attività β -galattosidica su *Klebsiella pneumoniae* e conta cellulare in caso di positività.

1. Preparazione del campione

Vari campioni in soluzione fisiologica (NaCl 0,85% in acqua) contenenti cellule di *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) vengono variamente diluiti. Per ogni prova viene verificato il numero di cellule tramite conta microbiologica su piastra.

2. Induzione dell'enzima e reazione enzima – substrato dopo lisi cellulare

L'induzione dell'enzima e l'espressione dell'attività dell'enzima indotto tramite lisi della membrana cellulare avvengono secondo il procedimento descritto nell'esempio 1

3. Misura

La misura viene eseguita secondo il procedimento descritto nell'esempio 1 utilizzando una retta di taratura precedentemente messa a punto per il ceppo batterico considerato $y=60,063x$.

y = numero di cellule

x = unità di fluorescenza



Slit 5;5	u.f.	u.f - B	Cellule/2ml
Bianco	232	0	0
Campione 1	257	25	1502
Campione 2	305	73	4385
Campione 3	323	91	5466
Campione 4	329	97	5826
Campione 5	401	169	10151
Campione 6	427	195	11900
Campione 7	448	216	12974
Campione 8	523	291	17478
Campione 9	526	294	17659

Campioni 1-9 riferiti a *Klebsiella pneumoniae*

u.f = Unità relative di fluorescenza

B = Bianco

Esempio 4 - Induzione di attività β -galattosidica e β -glucoronidica su *E.coli* in assenza di aminoacidi.

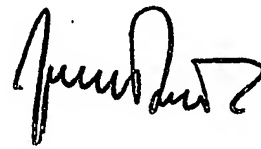
Vari campioni in soluzione fisiologica (NaCl 0,85% in acqua) contenenti cellule di *E.coli* (ATCC 25922) vengono variamente diluiti. Per ogni prova viene verificato il numero di cellule tramite conta microbiologica su piastra.

Le condizioni sperimentali per l'induzione dell'enzima, l'espressione dell'attività enzimatica dopo lisi cellulare e la misura fluorimetrica sono quelle descritte



nell'Esempio 1 per l'enzima β -galattosidasi e nell'Esempio 2 per l'enzima β -glucuronidasi, eccetto la presenza di aminoacidi.

I risultati del saggio fluorimetrico dimostrano che, in assenza degli aminoacidi nella soluzione di induzione, le cellule non producono i due enzimi inducibili in quantità rilevabile.



Rivendicazioni

1. Soluzione d'induzione da impiegare per la rapida rilevazione di cellule di Coliformi atta ad indurre, in assenza di crescita cellulare, l'espressione degli enzimi inducibili β -glucuronidasi e β -galattosidasi, tale soluzione comprendendo:
 - Almeno un aminoacido, preferibilmente una miscela di aminoacidi, in quantità tale da non permettere una crescita cellulare rilevabile delle cellule coliformi a contatto con esso entro un intervallo di tempo fra 0 e 120 min.
 - Un sistema tampone.
 - Ioni bivalenti e più particolarmente il magnesio Mg^{++} in concentrazione preferibilmente 0,5 mM.
 - Un induttore enzimatico.
2. Soluzione secondo la riv. 1 in cui l'aminoacido è in concentrazione fino a 80mM.
3. Soluzione secondo le riv. 1-2 comprendente almeno uno dei seguenti aminoacidi:
 - Tryptofano W.
 - Almeno uno tra Metionina M e Treonina T.
 - Isoleucina I e Leucina L.
4. Soluzione secondo la riv. 1 in cui l'aminoacido è scelto fra gli aminoacidi naturali: Alanina A, Cisteina C, Acido Aspartico D, Acido Glutammico E, Fenilalanina F, Glicina G, Istidina H, Isoleucina I, Lisina K, Leucina L, Metionina M, Asparagina N, Prolina P, Glutammina Q, Arginina R, Serina S, Treonina T,



Handwritten signature

Valina V, Triptofano W, Tirosina Y.

5. Soluzione secondo le riv. 1-4 in cui la miscela d'aminoacidi include gli aminoacidi naturali in forma levogira, ciascuno in quantità compresa nell'intervallo tra 0,01 mM e 0,05 mM.
6. Soluzione secondo le riv. 1-5 in cui il sistema tampone è un tampone fosfato a pH compreso tra 7,0 e 7,5, contenente NaCl, preferibilmente, ma non necessariamente allo 0,00012% (p/v).
7. Soluzione secondo le riv. 1-6 in cui l'induttore enzimatico è scelto fra isopropil- β -D-tiogalattopiranoside per la β -galattosidasi, in concentrazione preferibilmente 0,2mM, e metil- β -D-glucuronide per la β -glucuronidasi, in concentrazione preferibilmente 2mM, e relative miscele.
8. Soluzione secondo le riv. 1-7 comprendente ulteriormente un agente selettivo, con funzione permeabilizzante della membrana, come ad esempio sodiododecilsolfato.
9. Kit di analisi per la rilevazione rapida di cellule coliformi comprendente:
 - La soluzione di induzione secondo le riv. 1-8.
 - Una soluzione comprendente un substrato fluorescente.
 - Istruzioni per l'uso.
 - Strumentazione e solventi adeguati alla conduzione del metodo.
10. Kit secondo la riv. 9 in cui i coliformi sono scelti fra Coliformi Totali. Coliformi Fecali, E.coli.
11. Kit secondo la riv. 9 in cui la soluzione di induzione è sterilizzata per filtrazione su filtro avente porosità non superiore a 0,45 micron ed è in forma liofilizzata.
12. Kit secondo la riv. 9 in cui il substrato fluorescente è scelto fra MUGal e MUGlu



e relative miscele.

13. Kit secondo la riv. 9 comprendente ulteriormente un amplificatore di fluorescenza costituito da una soluzione acquosa di NaOH o altra base atta ad innalzare il pH della soluzione di induzione ad un valore compreso fra pH 11-12.

14. Kit secondo la riv. 9 comprendente ulteriormente un solvente organico di lisi, ad esempio cloroformio.

15. Kit secondo le riv. 9-14 da impiegare per analizzare campioni acquosi ottenuti da acque reflue, acque superficiali, acque di balneazione, acque dolci, acque marine, falde acquifere, alimenti, suoli.

16. Processo per la rilevazione rapida di cellule di batteri Coliformi comprendente gli stadi seguenti:

- Porre in contatto il campione da analizzare con una soluzione di induzione secondo le riv. 1-8 ad una temperatura compresa fra 30 e 50°C.
- Aggiungere un substrato fluorogenico.
- Provocare la rottura della membrana cellulare batterica con solvente organico in modo da permettere la fuoriuscita dell'enzima indotto.
- Mantenere ad una temperatura inferiore a 50°C per un tempo variabile in funzione del numero di cellule in condizioni di idrolisi del substrato fluorogenico con rilascio del corrispondente fluoroforo.
- Al termine, portare il pH della soluzione finale a oltre 11 con una base, ad esempio NaOH.

17. Processo secondo la riv. 16 in cui la temperatura viene mantenuta tra 30 e 40°C per la determinazione dei Coliformi Totali e tra 30 e 50°C per la



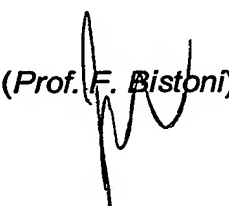
determinazione dei Coliformi Fecali o per E.coli.

18. Processo secondo la riv. 16 in cui il tempo minimo della fase di reazione enzimatica è di circa 10 minuti.
19. Processo secondo la riv. 16 in cui la quantità del fluoroforo viene determinata mediante saggio fluorimetrico a seguito della rispettiva reazione extracellulare degli enzimi da rilevare β -galattosidasi e β -glucuronidasi con i substrati fluorescenti metilumbelliferil- β -D-galattoside (MUGal) e metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUGlu).
20. Processo secondo la riv. 16 in cui il solvente organico di lisi è il cloroformio.
21. Processo secondo la riv. 16 in cui il substrato fluorescente è scelto fra MUGal in dimetisolfossido, MUGlu in soluzione acquosa e relative miscele.
22. Processo secondo la riv. 16 in cui il campione da analizzare viene preventivamente trattato con un'estrazione con una soluzione fisiologica o una soluzione di tampone fosfato.
23. Processo secondo la riv. 22 in cui il campione viene ulteriormente sottoposto a filtrazione su un filtro avente cut-off non superiore a 0,45 micron ed il filtro viene posto in contatto con la soluzione di induzione.
24. Processo secondo la riv. 16 in cui l'analisi del campione viene effettuata mediante fluorimetria con lunghezze d'onda di eccitazione comprese tra 330 e 390 nm, lunghezze d'onda di emissione comprese tra 410 e 470 nm e rispettive slit comprese tra 2,5 e 20 nm.

Terni, lì 29 Luglio 2003

ISRIM Scarl

(Prof. F. Bistoni)



ISRIM

ISTITUTO SUPERIORE DI RICERCA E FORMAZIONE
SUI MATERIALI E PER LE TECNOLOGIE AVANZATE



ISRIM Società Consortile a.r.l.
05100 Terni loc. Pentima Bassa 21
Tel. 0744 - 547801
Fax. 0744 - 470174

ISTANZA DI RETTIFICA

SF/P1046

Al:

Ministero Attività Produttive
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2, Roma

Oggetto: Rettifica del Brevetto italiano di invenzione n° TR 2003 A2 del 31 Luglio 2003

Io sottoscritto Prof. Francesco Bistoni, in qualità di Presidente della ISRIM S.C.ar.l. depositaria del Brevetto:

Numero: TR. 2003 A2

Data di deposito: 31 Luglio 2003

Inventori: Bodini Sergio, Santori Francesca

Titolo: "Metodo per la rilevazione di coliformi ed in particolare
Escherichia coli"

CHIEDE

le modifiche delle pagine 8, 10 e 11, delle rivendicazioni n°6 di pagina 25, n°14 e n°16 di pagina 26 e n°20 di pagina 27, e allega le pagine rettificare.

In fede



Allegati:

pgg. 8, 10, 11, 25, 26, 27 rettificare.

Il Presidente
Prof. Francesco Bistoni

1. Almeno un aminoacido, preferibilmente una miscela d'aminoacidi, in quantità tale da non permettere una crescita cellulare rilevabile delle cellule coliformi a contatto con esso entro un intervallo di tempo fra 0 e 120 min;
2. Un sistema tampone, come ad esempio Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , preferibilmente, ma non necessariamente, a pH compreso tra 6,0 e 7,5, contenente NaCl, preferibilmente, ma non necessariamente allo 0,01% (p/v);
3. Ioni bivalenti e più particolarmente il magnesio Mg^{++} in concentrazione preferibilmente 0,5 mM;
4. Un induttore enzimatico (i.e. isopropil- β -D-tiogalattopiranoside per la β -galattosidasi in concentrazione preferibilmente 0,2mM e metil- β -D-glucuronide per la β -glucuronidasi in concentrazione preferibilmente 2mM, e relative miscele);

Eliminato: 7,0

Eliminato: 0,00012%

Secondo l'invenzione, gli aminoacidi sono *essenziali* per ottenere l'induzione enzimatica; la miscela d'aminoacidi può includere preferibilmente tutti i 20 aminoacidi o solo alcuni di essi in quantità preferibilmente compresa nell'intervallo tra 0,01 mM e 0,05 mM ciascuno.

In particolare essa può contenere almeno uno dei seguenti aminoacidi:

- Triptofano W.
- Almeno uno tra Metionina M e Treonina T.
- Isoleucina I e Leucina L.

In generale la miscela sopra citata d'aminoacidi naturali è preferibilmente composta da una soluzione contenente i 20 aminoacidi naturali in forma levogira (Alanina A, Cisteina C, Acido Aspartico D, Acido Glutammico E, Fenilalanina F, Glicina G, Istidina H, Isoleucina I, Lisina K, Leucina L, Metionina M, Asparagina N, Prolina P, Glutamina Q, Arginina R, Serina S, Treonina T, Valina V, Triptofano

permettono un incremento del segnale di fluorescenza e contemporaneamente bloccano il continuo della reazione stessa. Non vi sono limiti di tempo per l'idrolisi, ma normalmente la sua durata di tempo è compresa tra 5 e 120 minuti e preferibilmente, ma non necessariamente, si protrae per 15 minuti. Il numero minimo di cellule rilevabili con il presente metodo è di circa 10 cellule/campione. I tempi dell'intera reazione sono preferibilmente inferiori a 120 minuti, più preferibilmente inferiori a 60 minuti, ancor più preferibilmente inferiori a 30 minuti, ancor più preferibilmente inferiori a 15 minuti e comunque variano a seconda del numero di cellule e il metodo è così sensibile che si riescono a rilevare fino a 10 cellule per campione, benché con tempo di analisi superiore a 20 minuti, ma pur sempre contenuti (tipicamente inferiori a 3 ore) rispetto ai metodi delle tecniche note.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione, la metodologia di rilevamento dei Coliformi si basa sull'utilizzo dei reagenti seguenti, che possono essere realizzati in forma di kit di analisi, unitamente alle metodologie appresso descritte:

- **Soluzione di Induzione Enzimatica (Reagente A):** il reagente comprende una soluzione acquosa comprendente: un sistema tampone, come ad esempio Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , preferibilmente ma non necessariamente a pH 7,2 (β -gal) e pH 6,5 (GUD); ioni bivalenti e più particolarmente il magnesio Mg^{++} , i quali ioni sono essenziali ad una concentrazione preferibilmente ma non necessariamente 0,5mM; almeno un aminoacido, preferibilmente ma non necessariamente Triptofano W, in concentrazione fino a 80mM; preferibilmente ma non necessariamente un altro aminoacido a scelta tra Metionina M e Treonina T, in concentrazione fino a 80mM e preferibilmente ma non necessariamente anche Isoleucina I e Leucina L in

Eliminato: a pH compreso tra 2 e 10

Formattato: Tipo di carattere: (Predefinito) Arial

concentrazione fino a 80mM; in generale è preferibile ma non necessario utilizzare tutti i 20 aminoacidi naturali, promotori dell'induzione, ad una concentrazione preferibilmente ma non necessariamente 0,02mM ciascuno; un induttore della sintesi della β -galattosidasi o della β -glucuronidasi, come ad esempio isopropil- β -D-tiogalattopiranoside o metil- β -D-glucuronide e relative miscele; un agente selettivo, con funzione permeabilizzante della membrana, come ad esempio sodiododecilsolfato; NaCl, preferibilmente ma non necessariamente allo 0,01% (p/v); la soluzione è sterilizzata ad esempio per filtrazione su filtro avente porosità non superiore a 0,45 micron e può essere in forma liofilizzata.

Eliminato: 0,00012%

- **Soluzione del Substrato Enzimatico (Reagente B):** il reagente comprende una soluzione di metilumbelliferil- β -D-galattoside (MUGal) sciolto in dimetilsolfossido e tampone fosfato, o una soluzione di metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUGlu) disciolto in una soluzione di tampone fosfato/triton-x 99/1, o una miscela delle due, preferibilmente ma non necessariamente caratterizzate dall'assenza di 4-metilumbelliferone (MU), opportunamente separato ad esempio tramite passaggio su colonna anionica (resina Amberlite IRA-410, Sigma per esempio) per ridurre la naturale presenza di 4-metilumbelliferone. Il reagente può essere in forma liofilizzata.
- **Soluzione di Amplificazione di Fluorescenza (Reagente C):** il reagente comprende una soluzione acquosa di NaOH o altra base che permette di amplificare fino a 4 volte tanto la naturale fluorescenza di 4-metilumbelliferone, effetto ottenibile a pH 11-12.
- **Solvente:** è un adatto solvente organico di lisi che provoca la rottura della

Valina V, Triptofano W, Tirosina Y.

5. Soluzione secondo le riv. 1-4 in cui la miscela d'aminoacidi include gli aminoacidi naturali in forma levogira, ciascuno in quantità compresa nell'intervallo tra 0,01 mM e 0,05 mM.
6. Soluzione secondo le riv. 1-5 in cui il sistema tampone è un tampone fosfato a pH compreso tra 6,0 e 7,5, contenente NaCl, preferibilmente, ma non necessariamente allo 0,01% (p/v).
7. Soluzione secondo le riv. 1-6 in cui l'induttore enzimatico è scelto fra Isopropil- β -D-tiogalattopiranoside per la β -galattosidasi, in concentrazione preferibilmente 0,2mM, e metil- β -D-glucuronide per la β -glucuronidasi, in concentrazione preferibilmente 2mM, e relative miscele.
8. Soluzione secondo le riv. 1-7 comprendente ulteriormente un agente selettivo, con funzione permeabilizzante della membrana, come ad esempio sodiododecilsolfato.
9. Kit di analisi per la rilevazione rapida di cellule coliformi comprendente:
 - La soluzione di induzione secondo le riv. 1-8.
 - Una soluzione comprendente un substrato fluorescente.
 - Istruzioni per l'uso.
 - Strumentazione e solventi adeguati alla conduzione del metodo.
10. Kit secondo la riv. 9 in cui i coliformi sono scelti fra Coliformi Totali, Coliformi Fecali, E.coli.
11. Kit secondo la riv. 9 in cui la soluzione di induzione è sterilizzata per filtrazione su filtro avente porosità non superiore a 0,45 micron ed è in forma liofilizzata.
12. Kit secondo la riv. 9 in cui il substrato fluorescente è scelto fra MUGal e MUGlu

Eliminato: 7,0

Eliminato: 0,00012%



e relative miscele.

13. Kit secondo la riv. 9 comprendente ulteriormente un amplificatore di fluorescenza costituito da una soluzione acquosa di NaOH o altra base atta ad innalzare il pH della soluzione di induzione ad un valore compreso fra pH 11-12.

14. Kit secondo la riv. 9 comprendente ulteriormente un solvente organico di lisi, ad esempio cloroformio, e/o agente di lisi, ad esempio triton-x.

15. Kit secondo le riv. 9-14 da impiegare per analizzare campioni acquosi ottenuti da acque reflue, acque superficiali, acque di balneazione, acque dolci, acque marine, falde acquifere, alimenti, suoli.

16. Processo per la rilevazione rapida di cellule di batteri Coliformi comprendente gli stadi seguenti:

- Porre in contatto il campione da analizzare con una soluzione di induzione secondo le riv. 1-8 ad una temperatura compresa fra 30 e 50°C.
- Aggiungere un substrato fluorogenico.
- Provocare la rottura della membrana cellulare batterica con agente di lisi in modo da permettere la fuoriuscita dell'enzima indotto.
- Mantenere ad una temperatura inferiore a 50°C per un tempo variabile in funzione del numero di cellule in condizioni di idrolisi del substrato fluorogenico con rilascio del corrispondente fluoroforo.
- Al termine, portare il pH della soluzione finale a oltre 11 con una base, ad esempio NaOH.

Eliminato: solvente organico

Eliminato:

17. Processo secondo la riv. 16 in cui la temperatura viene mantenuta tra 30 e 40°C per la determinazione dei Coliformi Totali e tra 30 e 50°C per la

determinazione dei Coliformi Fecali o per E.coli.

18. Processo secondo la riv. 16 in cui il tempo minimo della fase di reazione enzimatica è di circa 10 minuti.

19. Processo secondo la riv. 16 in cui la quantità del fluoroforo viene determinata mediante saggio fluorimetrico a seguito della rispettiva reazione extracellulare degli enzimi da rilevare β -galattosidasi e β -glucuronidasi con i substrati fluorescenti metilumbelliferil- β -D-galattoside (MUGal) e metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUGlu).

20. Processo secondo la riv. 16 in cui l'agente di lisi è il cloroformio e/o il triton-x.

Eliminato: il solvente organico

21. Processo secondo la riv. 16 in cui il substrato fluorescente è scelto fra MUGal in dimetilsolfossido, MUGlu in soluzione acquosa e relative miscele.

22. Processo secondo la riv. 16 in cui il campione da analizzare viene preventivamente trattato con un'estrazione con una soluzione fisiologica o una soluzione di tampone fosfato.

23. Processo secondo la riv. 22 in cui il campione viene ulteriormente sottoposto a filtrazione su un filtro avente cut-off non superiore a 0,45 micron ed il filtro viene posto in contatto con la soluzione di induzione.

24. Processo secondo la riv. 16 in cui l'analisi del campione viene effettuata mediante fluorimetria con lunghezze d'onda di eccitazione comprese tra 330 e 390 nm, lunghezze d'onda di emissione comprese tra 410 e 470 nm e rispettive slit comprese tra 2,5 e 20 nm.

Terni, il 29 Luglio 2003

ISRIM Scrl

(Prof. F. Bistoni)